PRACTICAL

BIOTECON Diagnostics

foodproof® STEC Screening LyoKit（-5' Nuclease-） [R 602 11-1] [R 602 11-2]

Ver.1, Sep./2013

3216D60211　foodproof STECスクリーニング検出キット　取扱説明書　抄訳

ご注意：原文および内容を確認してください。取扱方法、仕様等は予告なく変更されます。原文には、この抄訳に含まれていない図表などがありますので必ず参照するようにしてください。この抄訳とキット同梱の原文とで相違ある場合には原文を優先してください。　抄訳 by 株式会社 プラクティカル（2014/11/26）

厚生労働省通知 食安監発 1120 号（H26）内の VT 遺伝子検出法として収載されています。（以降：通知と記します）
同通知での検査では、DNA 抽出法および対応機種や設定など、通知の記載に従ってください。

1．内容

試験数

PCR 96 反応分。（陽性および陰性コントロール各 1 とした場合、最大 94 反応）

保管と安定性

■　暗所、2℃～8℃ 冷蔵保管。有効期限はラベルに記載。

■　開封後は下記キット内容表に記載のとおり保管。

キット内容

	foodproof STEC Screening LyoKit マイクロプレート 96 反応 （8 連チューブストリップ x12） RP：透明 Regular Profile Tube =0.2mL タイプ LP：白色 Low Profile Tube =0.1mL タイプ	stx1−、stx2−、eae 用プライマー・プローブミックス、 内部コントロール DNA、Taq DNA ポリメラーゼ、 Uracil-DNA N-グリコシラーゼ（=易熱性：キャリーオーバー防止用） 以上すべての試薬分注済み・凍結乾燥 アルミパウチに密封の上、2℃～8℃ 冷蔵保管 **遮光すること。防湿すること。**
② 紫色	Control Template コントロールテンプレート	1 x 250 μL　DNA プラズミド溶液 陽性コントロールとして使用 2℃～8℃ 冷蔵保管
③ 透明	H_2O, PCR-grade PCR グレード 水	2 x 1mL　PCR グレード水、ヌクレアーゼフリー 陰性コントロールとして使用 2℃～8℃ 冷蔵保管
	キャップ 8 連 x12 本	試料滴下後に使用

他に必要な試薬・資器材

FAM、HEX、ROX、Cy5 を同時検知するリアルタイム PCR 装置※1
当キットのチューブがお使いの装置に適用できない場合は、試料を加え懸濁した後に、内容全部を適切な PCR チューブ/プレートに移送して試験してください。

ヌクレアーゼフリー、エアロゾル対応ピペットチップおよびマイクロピペット

前処理（DNA 抽出）キット※2：foodproof シリーズ StarPrep One Kit か Magnetic Sample Preparation Kit

【※1：通知法検査では、別途、通知記載の対応機種を使用してください。ROX チャンネルは使用しません。】
【※2：通知法検査では、別途、通知記載の DNA 抽出法に従ってください。】

本品は食品衛生・環境等に関わる自主検査用キットであり、臨床検査等診断に用いることはできません。 必ず取扱説明書等をご覧頂き、使用・保管・廃棄等の方法には充分ご注意下さい。 価格・仕様など、内容を予告無く変更する場合があります。
株式会社プラクティカル Tel 043-242-0425 Fax 043-242-0445　E-mail: sales@practical.jp　Web site: www.practical.jp

適用範囲

foodproof® STEC Screening LyoKit – 5' Nuclease – はベロ毒素産生大腸菌汚染が有りうる様々な食品や原材料において、適切な方法で培養され抽出されたベロ毒素産生大腸菌 DNA を迅速に検出することを目的としています。診断目的に用いることはできません。

このキットは、FAM、HEX、ROX、Cy5 を同時検知するリアルタイム PCR 装置用に開発されてきました。このキットの性能は以下の機器でテストされました。
LightCycler® 480、LightCycler® 96 (Roche Diagnostics), ABI 7500 (Applied Biosystems), Mx3005P®(Agilent Technologies), PikoReal® 24 (Thermo Scientific)

2. 使用方法

2. 1 はじめに

注意
この方法では PCR による DNA 増幅を行います。このキットには PCR に必要な試薬は全て含まれています。信頼性のある結果を得るために、全てのアッセイ操作はヌクレアーゼフリーの状態で行う必要があります。キャリーオーバー、クロスコンタミを防ぐため、下記に従ってください。

■必要な量だけの試薬を調製し、試験室内の他の試薬とは隔離しておくこと。
■ヌクレアーゼフリーの試験器具を用いること。 ■グローブを着用すること。
■試料や試薬のクロスコンタミを防ぐため、エアロゾル対応のピペットチップを用いること
■ボトルから直接ピペットせず、必要量だけを新しいチューブに分取しておくこと
■DNA 抽出、PCR 試料作成、PCR 機器設置は、それぞれ物理的に別の場所で行うこと
■ピペット操作は PCR 用ベンチ内で行うこと

PCR ミックス等が充填されているマイクロプレートは、必ず遮光・防湿しておくこと。

試料
阻害物がなく、純度、濃度など PCR に適した試料を用いること。原料や食品培養物からの DNA 抽出は、試料調製キットの取扱説明書を参照すること。

DNA 抽出
BIOTECON 社ではあらゆる食品や原料に適した試料調製キットを提供しています。お問合せください。

陽性コントロール
試料と並行して必ず陽性コントロールを試験すること。試料 DNA に替えて、キット添付のコントロールテンプレート(②紫)、あるいは陽性試料から調製した抽出 DNA を加えて反応させます。

陰性コントロール
試料と並行して必ず陰性コントロールを試験すること。試料 DNA に替えて、キット添付の PCR グレード水(③透明)を加えて反応させます。

2．2 手順

リアルタイム PCR のプログラム

以下の手順は、FAM(stx1-gene)、HEX(stx2-gene)、ROX(eae-gene)※3、Cy5(internal control)のチャンネルを持つリアルタイム PCR 装置用に最適化されたものです。装置のマニュアルを参照のうえ、試料準備の前に、次のプロトコルをプログラム設定してください。

Pre-Incubation		1 cycle	
	Step 1:	37℃	4 分
	Step 2:	95℃	5 分
Amplification		50 cycles	
	Step 1:	95℃	5 秒
	Step 2:	60℃	60 秒

Fluorescence Detection : Step 2

Cooling		1 cycle	（本文にありませんが、キャップ脱漏防止のため必須）
		40℃	30 秒

NOTE:
いくつかのリアルタイム PCR 装置では、passive reference dye の使用や probe quencher の種類を指定する必要があります。このキットでは、non-fluorescent(dark) quencher を使用しており、passive reference dye は含んでおりません。
Agilent Mx3005P の場合：”Instrument””Filter Set Gain Settings”をクリックし、同ダイアログボックスで FAM の Filter Set Gain Setting を”x 1”に設定してください。
Roche LC480 波長設定 LC480 I=FAM 483/533、HEX 523/568、ROX 558/610、Cy5 615/670nm、 LC480 II 波長設定：FAM 465/510、HEX 533/580、ROX 533/610、Cy5 618/660 nm

【※3：通知法検査では、ROX チャンネルは使用しません。】

PCR 反応試料の準備

NOTE: PCR チューブストリップは吸湿を避けるため、添付のアルミバッグで乾燥剤とともに冷蔵保管してください。

1. 必要数のチューブストリップをアルミバッグから取り出す。（バッグはすぐに密閉）
2. 適宜のラックにストリップを置き、試薬ペレットが底部にあることを確認する。
3. 注意深くキャップを取り外して捨てる。
   NOTE: 吸湿を避けるため、必要以上に外気にさらさないようにしてください。直前に開栓。
4. 適宜のチューブに下記試料などを各 25μL ずつ滴下し、ペレットが完全に溶解するまでピペットで上下する。

   - 試料※4 : 抽出 DNA 25μL（少量の場合は PCR グレード水③ を 25μL になるよう補う）
   - 陰性コントロール: PCR グレード水（③透明） 25μL
   - 陽性コントロール: Control Template（②紫） 25μL

【※4：通知法検査では、PCR グレード水 20μL を加えて溶解後、通知 DNA 抽出法による試料 5μL を加えます。】

5. キャップストリップで確実に密封する。
   NOTE: キャップで密閉した後にミキシングしてペレットを溶解してもよい。
   コンタミリスクを軽減するため、一度に1チューブずつ準備することを推奨します。
6. 短時間、遠心機にかける。
7. リアルタイム PCR 装置にセットし、上記の設定で試験・解析する。

NOTE: ABI7500 では Strip 用のトレー、LightCycler480 では Strip 用のアダプターなど、機器により専用のトレー/アダプターが必要になります。（LightCycler480 用アダプターについては別途お問合せください。）また、例えば二つのストリップを 1 列目と 12 列目におくなど、サイクラーブロックのバランスを保つよう配置することが必要になる場合もあります。
当キットのチューブがお使いの装置に適用できない場合は、試料を加え懸濁した後に、内容全部を適切な PCR チューブ/プレートに移送して試験してください。

本品は食品衛生・環境等に関わる自主検査用キットであり、臨床検査等診断に用いることはできません。 必ず取扱説明書等をご覧頂き、使用・保管・廃棄等の方法には充分ご注意下さい。 価格・仕様など、内容を予告無く変更する場合があります。
株式会社プラクティカル Tel 043-242-0425 Fax 043-242-0445 E-mail: sales@practical.jp Web site: www.practical.jp

2．3 結果解釈

stx1(VT1)の増幅は FAM 標識プローブ用、stx2(VT2)の増幅は HEX 標識プローブ用、eae の増幅は ROX 標識プローブ用、内部コントロールの増幅は Cy5 標識プローブ用のそれぞれの蛍光チャンネルにより解析されます。

各試料ごとに、FAM（Stx1(VT1)）、HEX（Stx2(VT2)）、ROX(eae)、Cy5（内部コントロール）の各チャンネルの結果を比較して下記のとおり解釈します。

FAM	HEX	ROX	Cy5	結果の解釈
＋	＋	＋	＋あるいは－	stx1、stx2、eae 陽性
－	＋	＋	＋あるいは－	stx2、eae 陽性
＋	－	＋	＋あるいは－	stx1、eae 陽性
＋	＋	－	＋あるいは－	stx1、stx2 陽性
－	＋	－	＋あるいは－	stx2 陽性
＋	－	－	＋あるいは－	stx1 陽性
－	－	＋	＋あるいは－	STEC 陰性、eae 陽性
－	－	－	＋	STEC 陰性、eae 陰性
－	－	－	－	試験無効

NOTE：曖昧で判別が難しくならないよう、FAM、HEX、ROX、Cy5 各チャンネルの適切なキャリブレーションが必須です。詳しくは機器のマニュアルを参照してください。

【通知法検査では、auto 解析できない場合の解析方法が記載されています。ROX は使用しません。】

3. トラブルシューティング

現象	考えらる原因	推奨対策
陽性コントロールも含めシグナル増幅がいずれも認められない	チャンネルの選択の誤り	・FAM、HEX、ROX、Cy5 で正しく設定する
	ピペット操作のエラー	・準備操作を確認して再試験する ・常に陽性コントロールを並行して試験する
	プログラム設定のエラー	・サイクル設定を確認する
Cy5 においてシグナル増幅が認められない	試料中の反応阻害物質（例えば精製不足による）	・精製用に推奨の試料調製キットを使用する ・試料を希釈する、あるいは滴下量を少なくする（例えば 25μL ではなく 5μL など）
蛍光強度が低すぎる	キット保管が適切でない	・キットは 2～8℃の冷蔵、遮光防湿で保管する
	目的 DNA の量が少ない	・試料 DNA の量を増やす。DNA 精製の方法によっては阻害の影響が起こりえます。
蛍光ベースラインが著しく低下する	凍結乾燥 PCR ミックスの溶解が不完全	・常に完全に溶解していることを確認する
陰性コントロールが陽性反応を示す	キャリーオーバーコンタミネーション	・該当と考えられるすべての溶液を交換する ・新たな試薬/溶液で初めから再試験する ・キャリーオーバーコンタミ防止に関する作業標準に沿って試料、キット、資材を扱う ・試料および陰性コントロールをチューブに封入した後に陽性コントロールを扱う
蛍光強度が変動する	溶解・試料滴下後の PCR ストリップの遠心不足	・常に完全に遠心処理されていることを確認する
	チューブやキャップの汚れ（例えば皮脂など）	・チューブ操作やシール時にはグローブを着用
ペレットが容易に溶解しない	凍結乾燥試薬の吸湿	・凍結乾燥試薬充填のストリップは乾燥剤とともにアルミバッグに密封 ・チューブを開栓後ただちに試料を滴下する

本品は食品衛生・環境等に関わる自主検査用キットであり、臨床検査等診断に用いることはできません。 必ず取扱説明書等をご覧頂き、使用・保管・廃棄等の方法には充分ご注意下さい。 価格・仕様など、内容を予告無く変更する場合があります。
株式会社プラクティカル Tel 043-242-0425 Fax 043-242-0445 E-mail: sales@practical.jp Web site: www.practical.jp

4. 追加情報

しくみ

このキットには、結果解釈の信頼性を高めるために、必要なすべての試薬とコントロールテンプレートが含まれています。

阻害物質による誤った陰性判断を防ぐため、内部コントロールを含んでいます。また、STEC の DNA を FAM、HEX、ROX チャンネルで検知する一方で、内部コントロールを特異的に結合し Cy5 チャンネルで検知できる加水分解プローブを設計開発しました。 試料中の目的DNAが陰性で、かつ内部コントロールが増幅すれば、試料中の STEC DNA は陰性であることを明示する一方で、試料中の目的 DNA が反応阻害物質により陰性となる場合には、内部コントロールの増幅も同様に阻害されます。

コンタミリスクを最小化するため、陽性コントロールを除くすべての試薬が充填されています。

プライマーおよびプローブは食品試料中の STEC DNA を特異的に検知します。

このキットの性能は既述のリアルタイム PCR 装置の使用においてのみ保証されています。

試験原理

1. PCR 上での配列特異プライマーを用い、PCR 装置が stx1-(VT1-)、stx2-(VT2-)、eae 遺伝子の特異配列断片を増幅します。
2. TaqDNA ポリメラーゼの 5' ヌクレアーゼ活性によるプローブハイブリダイズで生成する蛍光を通じて、配列断片の増幅を、PCR 装置がリアルタイムで検知します。プローブには 5' 末端に蛍光レポーターが、3' 末端にクエンチャーが修飾されています。
3. TaqDNA ポリメラーゼの働きによる各 PCR サイクルのアニーリングと伸長の過程で、プローブは増幅物の内部配列にハイブリダイズし、またその後開裂します。この開裂により、レポーターとしての蛍光物質がクエンチャーから引き離され、蛍光シグナルを発します。
4. PCR 装置が、レポーターが発する蛍光シグナルをリアルタイムに測定していきます。

キャリーオーバー コンタミネーションの防止

易熱性の UNG (Uracil-DNA N-Glycosylase) は PCR 反応間の増幅産物持ち込みコンタミネーションの防止に適しています。このテクニックは、先の増幅反応で dUTP (deoxyuridine triphosphate)により取り込ませたウラシル塩基に対して、次の PCRミックスに加えて行うUNG処理によるものです。UNG はウラシル塩基が取り込まれたあらゆる部位で DNA を分裂します。脱塩基された部位は最初のステップの高温により分解されて PCR により増幅されるテンプレートではなくなり、また UNG も同様に不活化されます。ネイティブな DNA(すなわち試料から抽出された DNA)は Uracil を含んでおらず、この過程では劣化することはありません。このキットは、dTTP に替え dUTP を、そして UNG を含むことで、コンタミネーション防止を可能にしています。

背景情報

志賀毒素産生大腸菌はヒトが感染すると溶血性尿毒症症候群などのおそれがある大腸菌です。さまざまな名称があり、腸管出血性大腸菌(EHEC)、志賀様毒素産生大腸菌(STEC)、溶血性尿毒症症候群大腸菌(HUSEC)、ベロ毒素産生大腸菌(VTEC)などとも呼ばれます。[1]

これらの志賀様毒素(ベロ毒素)産生大腸菌は重篤な食中毒をもたらします。

これらは毒素原性大腸菌(ETEC)、腸管病原性大腸菌(EPEC)、腸管侵入性大腸菌(EIEC)、腸管付着性大腸菌(EAEC)、分散付着性大腸菌(DAEC)など他の病原型とは区別されます。

志賀毒素の二つの遺伝子はそれぞれ変異型があり、それぞれstx1、stx1c、stx1dと、stx2、stx2c、stx2d、stx2f、stx2gがあります。このキットはこれらすべての変異型を検知します。

このキットによる志賀毒素産生大腸菌の検知は、ISO/TS13136 法 [2]、USDA-FSIS method MLG 5B 法 [3]に準拠しており、これらの参照標準法もまたstx遺伝子とともにeae遺伝子をスクリーニングしています。

本品は食品衛生・環境等に関わる自主検査用キットであり、臨床検査等診断に用いることはできません。 必ず取扱説明書等をご覧頂き、使用・保管・廃棄等の方法には充分ご注意下さい。 価格・仕様など、内容を予告無く変更する場合があります。
株式会社プラクティカル Tel 043-242-0425 Fax 043-242-0445 E-mail: sales@practical.jp Web site: www.practical.jp

References
1. Karch H, Tarr P, Bielaszewska M (2005). "Enterohaemorrhagic Escherichia coli in human medicine.". Int J Med Microbiol 295 (6-7): 405-18.
2. ISO/TS 13136:2012 "Microbiology of food and animal feed —Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups".
3. FSIS Microbiology Laboratory Guidebook (MLG) 5B, "Detection and Isolation of Non-O157 Shiga-Toxin Producing Escherichia coli (STEC) from Meat Products", 2011.

品質管理

このキットはLightCycler 480システムを用いて機能試験を行っています。

以下、翻訳を省略し、原文を転載します。

5. Supplementary Information

5.1 Ordering Information

BIOTECON Diagnostics is offering a broad range of reagents and services. For a complete overview and for more information, please visit our website at www.bc-diagnostics.com.

5.2 License

License Notice
NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US:5,804,375, 5,538,848, 5,723,591, 5,876,930, 6,030,787, 6,258,569. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product solely in Food Testing Applications and Genetically Modified Organism (GMO) Testing Applications, including reporting results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, and also for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. Further information on purchasing licenses may be obtained from the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

The purchase price of this product includes limited, nontransferable rights under U.S. Patent No. 7,687,247 owned by Life Technologies Corporation to use only this amount of the product to practice the claims in said patent solely for activities of the purchaser for bioburden testing, environmental testing, food testing, or testing for genetically modified organisms (GMO) in accordance with the instructions for use accompanying this product. No other rights are conveyed, including no right to use this product for *in vitro* diagnostic, therapeutic, or prophylactic purposes. Further information on purchasing licenses under the above patent may be obtained by contacting the Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Email: outlicensing@lifetech.com.

5.3 Trademarks

foodproof® is a trademark of BIOTECON Diagnostics GmbH.
Other brand or product names are trademarks of their respective holders.

5.4 Contact and Support

If you have questions about this or any other product of BIOTECON Diagnostics, please contact our Technical Support staff (for details see www.bc-diagnostics.com). Our scientists commit themselves to providing rapid and effective help. We also want you to contact us if you have suggestions for enhancing our product performance or using our products in new or specialized ways. Such customer information has repeatedly proven invaluable to us and the worldwide research community.

6. Change Index

Version 1, September 2013:
First version of the package insert.